

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 4 4 4 号	学位授与年月日	平成 1 9 年 7 月 2 0 日
氏 名	浅 井 竜 彦		
論文題目	Blockade of the 4-1BB (CD137)/4-1BBL and/or CD28/CD80/CD86 costimulatory pathways promotes corneal allograft survival in mice (4-1BB(CD137)/4-1BBL 及び CD28/CD80/CD86 補助刺激経路の抑制はマウスにおけるアロ角膜移植片の生存を促進させる)		

博士(医学) 浅井 竜彦

論文題目

Blockade of the 4-1BB (CD137)/4-1BBL and/or CD28/CD80/CD86 costimulatory pathways promotes corneal allograft survival in mice

(4-1BB (CD137)/4-1BBL及びCD28/CD80/CD86補助刺激経路の抑制はマウスにおけるアロ角膜移植片の生存を促進させる)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

拒絶反応において重要な免疫反応は抗原特異的T細胞活性化による免疫応答である。外来抗原が抗原提示細胞 (antigen presenting cell; APC) によりT細胞に提示され、その抗原に特異的なT細胞の増殖、サイトカインの産生、各種の機能細胞への分化が起こる。しかしT細胞の活性化には、この細胞レセプターを介する抗原特異的なシグナル(シグナル1)だけでは不十分で、補助刺激分子間 (costimulatory) の相互作用により伝えられるシグナル2が必要である。また補助刺激が与えられなかった場合、抗原特異的な不応答性 (アネルギー) が誘導される。補助刺激分子の中でもCD28分子はAPC上のB7分子群 (CD80 (B7-1), CD86 (B7-2)) との相互作用により、T細胞に活性化シグナルを伝達し、多くのサイトカインの産生を誘導するなど、T細胞の増殖に決定的な役割を果たしている。4-1BB (CD137) はtumor necrosis factor (TNF) レセプタースーパーファミリーの一つで、4-1BBはおもに活性化CD4とCD8 T細胞に発現する。また、リガンドである4-1BBLは活性化B細胞、成熟樹状細胞、活性化マクロファージなどで発現する。本研究はアロ角膜移植片におけるこれらの役割について、抗4-1BB及び抗4-1BBL抗体やCD28と4-1BB補助刺激分子ノックアウト (KO) マウス及びダブルノックアウト (DKO) マウスを用いて検討した。

〔材料ならびに方法〕

1. 野生型 (WT) マウスのアロ角膜移植 (抗4-1BBアゴニスト抗体及び抗4-1BBLアンタゴニスト抗体の効果) : レシピエントにC57BL/6 (B6) -WTを用い、ドナーとしてBALB/c-WTを用いた。マウス角膜移植は既知の方法で行った。抗4-1BB抗体と抗4-1BBL抗体を投与し、移植片の生存曲線を比較した。
2. KOマウスへのアロ角膜移植 : レシピエントにBALB/c-WT、4-1BBKO、CD28KO、4-1BB/CD28DKOを用い、ドナーとしてB6-WTを用いた。並行してレシピエントにB6-WT、4-1BBKO、CD28KO、CD80/CD86DKOを用い、ドナーとしてBALB/c-WTを用いた。各々の移植片での生存曲線を比較した。
3. 頸部リンパ節のMixed Lymphocyte Reaction (MLR) によるリコールレスポンスと移植片中の細胞分画についてフローサイトメーター (FACS) を用いて検討した。次にB6-WTの移植片中の4-1BB、4-1BBL及びサイトカインの発現をRT-PCRを用いて、ケモカインについてはRNase protection assay (RPA) を用いて検討した。併せて免疫染色を行い移植片中のCD4⁺及びCD8⁺細胞数を比較検討した。

〔結果〕

WTマウスのアロ角膜移植での抗4-1BB抗体及び抗4-1BBL抗体の効果としては、抗4-1BB抗体投与群では、200 µg投与群においては移植片の生存が有意に減少し、用量依存的であった。一方で抗4-1BBL抗体投与群は、生存に有意な影響を与えなかった。各種KOマウスへのアロ角膜移植の結果では、レシピエン

トがBALB/cのアロ移植片のmedian survival time (MST)はWTで14日、一方4-1BBKOは21.5日、CD28KOは40日、4-1BB/CD28DKOは52.5日であった。レシピエントがB6のアロ移植片のMSTはWTで12日、一方4-1BBKOは21日、CD28KOは23日、CD80/CD86DKOは36日であった。全てのKO群はWT群に比較して有意に移植片の生存が延長していた。MLRは長期生存群で減弱する傾向を示していた。RT-PCRの結果から4-1BBは移植後3日から移植片中に発現していた。FACSでは、長期生存群でマクロファージやCD4⁺及びCD8⁺T細胞が減少傾向を示していた。免疫染色では長期生存群でCD4⁺及びCD8⁺T細胞が減少傾向を示した。

〔考察〕

アロ角膜移植に、4-1BBKOと4-1BB/CD28DKOをレシピエントとして使用した報告は初めてである。本研究の結果から以下の3つの知見が得られた。1. アゴニスト抗4-1BB抗体投与はアロ角膜移植片の拒絶を促進したが4-1BBKOでは移植片の生存を延長させた。2. 4-1BBKOまたはCD28KOではアロ角膜移植片生存を延長したが、4-1BBとCD28を共にKOした場合では有意な相乗効果を示さなかった。3. CD80/CD86DKOは4-1BBKOに比較して有意に生存が延長していた。抗4-1BBL抗体投与群でアロ角膜移植片生存を延長しなかったことは、4-1BBKOにおいてアロ角膜移植片の生存を延長させたことと矛盾していた。この機序として4-1BBKOでは、完全に4-1BBと4-1BBLとのシグナルをブロックできたのに対して、抗4-1BBL抗体単独では、角膜が無血管領域という特殊な環境であることからシグナルのブロックが不完全であった可能性が示唆された。4-1BBKO、CD28KO、4-1BB/CD28DKOはWTに比較して有意にアロ角膜移植片生存を延長していたが、4-1BB/CD28DKOでは生存に有意な相乗効果を認めなかった。実際に4-1BBは活性型のレセプターでその発現は恒常的ではなく、その活性化にはアロ抗原の刺激とCD28等の恒常的に発現している補助刺激分子のシグナルを必要とすることが原因として考えられた。CD80/CD86DKOで有意にアロ角膜移植片生存を延長させたことは、ドナー角膜にレシピエント角膜から浸潤してきたAPC上のCD80/CD86分子からのシグナルが、T細胞上の4-1BBやCD28分子以上に重要な役割を果たしている可能性があると考えられた。

〔結論〕

4-1BB/4-1BBL及びCD28/CD80/CD86の補助刺激分子のシグナルをブロックしてもアロ角膜移植片の拒絶を完全に抑制する事はできないが、移植片の生存延長に効果的であった。本研究から4-1BB/4-1BBL補助刺激はCD28/CD80/CD86補助刺激と同様にアロ角膜移植片の生存に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

移植角膜の拒絶反応は臨床的に10～30%の頻度で認められ、大きな問題となっている。この拒絶反応はT細胞によって惹起されることが知られているが、T細胞の活性化には、T細胞受容体(TCR)からの第一のシグナルに加えて、補助刺激分子からの第二のシグナルが必要である。補助刺激分子無しでのTCRの刺激は当該T細胞をアネルギー(免疫不応答性)に誘導する。補助刺激分子は多数知られているが、最も重要なものはT細胞に発現しているCD28である。これに対するリガンドとしては、抗原提示細胞上のB7分子群(CD80、CD86)が知られている。その他のT細胞補助刺激分子として、最近注目を集めているものに

4-1BB (CD137)がある。4-1BBはTNFレセプタースーパーファミリーに属し、主に活性化CD4⁺及びCD8⁺T細胞に発現する。そのリガンドである4-1BBLは活性化B細胞、樹状細胞、活性化マクロファージに発現している。そこで申請者はアロ角膜移植の拒絶反応におけるこれら補助刺激分子の役割を、アゴニスト抗体、アンタゴニスト抗体、ノックアウト (KO) マウスを用いて検討した。

得られた主な結果は以下の通りである。

- (1) 抗体による検討：野生型 (WT) マウスのアロ角膜移植 (レシピエント：C57BL/6 (B6)、ドナー：BALB/c) に抗4-1BBアゴニスト抗体、又は抗4-1BBLアンタゴニスト抗体を投与したところ、抗4-1BB抗体投与群で、用量依存的な移植片の拒絶反応の促進が認められた。一方、抗4-1BBL抗体は有意な影響を与えなかった。
- (2) BALB/c KOマウスによる検討：レシピエントに各種BALB/c KOマウスを用いたところ、WTではB6角膜のmedian survival time (MST) は14日であるのに対し、4-1BBKOは21.5日、CD28KOは40日、4-1BB/CD28DKOは52.5日とKOマウスで有意なMSTの延長を認めた。
- (3) B6 KOマウスによる検討：レシピエントにB6マウスを用いたところ、BALB/c角膜移植片のMSTはWTで12日であったのに対し、4-1BBKOでは21日、CD28KOは23日、CD80/CD86DKOでは36日とKOマウスで有意な延長を認めた。
- (4) Mixed Lymphocyte Reaction (MLR)：上記拒絶反応を起こしたマウスの頸部リンパ節を用いて、MLRを行ったところ、長期生着群で反応が減弱する傾向を示した。
- (5) RT-PCR：4-1BBは移植角膜に3日後から発現していた。
- (6) Flow cytometry：長期生着群で、移植角膜中のT細胞、マクロファージの減少が認められた。
- (7) 免疫染色：長期生着群で、移植角膜中のCD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞が減少していた。

以上より、申請者は、4-1BB/4-1BBL補助刺激はCD28/CD80/CD86補助刺激と同様にアロ角膜移植片の拒絶反応に重要な役割を果たしていることを示した。

審査委員会では、技術的に困難なマウスのアロ角膜移植を行い、その拒絶反応における4-1BB/4-1BBL補助刺激の役割を明らかにした点を高く評価した。

以上の研究に対し、審査委員会では以下の質疑を行った。

- 1) 角膜移植の方法について
- 2) BALB/c及びB6バックグラウンドのKOマウスの作製について
- 3) 用いた各種KOマウスに異常は認められなかったか
- 4) MLRの測定に用いたAlamar Blue法の原理について
- 5) マウスのアロ角膜移植が100%拒絶される理由について
- 6) 角膜移植手術の合併症について
- 7) 移植角膜片から実験に供した5 X 10⁴個の細胞を得るのに必要な角膜の数について
- 8) 用いた抗体の量を決定した根拠は
- 9) TSK-1抗体が無効であった理由について
- 10) 拒絶反応をMSTでなく、opacity scoreで判定した場合の結果について
- 11) B6バックグラウンドのレシピエントでは、4-1BBKOとCD28KOマウスで拒絶反応に差がなかった理由は
- 12) 拒絶角膜に発現したケモカインの意義について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で判定した。

論文審査担当者	主査	小 出 幸 夫	
	副査	瀧 川 雅 浩	副査 小 川 法 良